光遗传学技术研究进展[1]

郭轩彤[1]　张春波[2]

（1 南昌大学玛丽女王学院 南昌 330031；2 南昌大学药学院 南昌 330031）

摘要：光遗传学技术是结合遗传学和光学对生物体特定细胞实现精确光控的新兴生物技术。自基于微生物视蛋白的光遗传学策略应用以来，光遗传学在视蛋白的开发与优化，基于病毒和重组酶的遗传学定位表达以及光学传输技术等方面都取得了显著进展。光遗传学在现代神经生物学领域应用广泛，在神经环路、行为、中枢神经系统疾病、精神疾病的机理研究中发挥着重要作用。本文主要介绍光遗传学技术的发展历程，重点介绍光遗传学工具的优化以及定位表达，旨在为光遗传学及相关领域的研究发展提供参考。

关键词：光遗传学技术；光学控制；视蛋白；神经生物学

Research Progress of Optogenetic Techniques

GUO Xuan-tong [1]　ZHANG Chun-bo [2]

（1.Nanchang Joint Programme, Queen Mary University of London, Nanchang 330031, China；

2.School of Pharmacy, Nanchang University, Nanchang 330031, China）

Abstract：Optogenetics is an emerging biological technique that combines optics and genetics to precisely control specific cells within organisms. Since the application of microbial opsins, optogenetics has gained substantial progresses in discovering opsins, optic-control methods and genetic strategies that are based on viruses and recombinases. Optogenetics apply widely in modern neuroscience, playing important roles in the study of neural circuits and behavior, the pathological mechanism of various central nervous system diseases and psychiatric disorders. This review summarizes the development of optogenetic techniques, meanwhile emphasizes the latest advances in the opsin exploration and localized expression, aiming to provide references for research in optogenetics and related fields.

Key words：Optogenetic Techniques; Light Control; Opsin; Neurobiology

[1] 基金：国家自然科学基金（81501129），江西省自然科学基金（20161BAB215200, 20171ACB21001)

通讯作者：张春波，电子邮箱：*cbzhang@ncu.edu.cn*

光遗传学技术是结合光学和遗传学技术对特定细胞、组织、环路中某一事件实现精确控制的新兴生物技术[1]。光遗传学核心组分包括能对光刺激起反应并产生效应的感光元件以及对此活动记录分析的相关技术，主要涵盖 1. 将光控元件表达在特定细胞或组织；2. 将光作为刺激源递送到目标细胞或组织；3.记录输出并对其进行分析[2]。早在 1971 年，就有研究发现细菌中有能够感光的光敏蛋白，但当时未被用于发展光控元件[3]。2005 年，微生物视紫红质蛋白被证明能够成功表达于哺乳动物特定神经元并赋予其感光能力从而引起激活效应[4]。在随后的十多年中，随着神经生物学领域对单组份光控元件的需求，光遗传技术迅速发展并被广泛应用于神经生物学研究中，例如以帕金森病、癫痫、自闭症为代表的神经精神性疾病的机理研究[5][6]。本文详细阐述了光遗传学技术发展的历史，并就光遗传技术中的微生物视蛋白的改造优化成果，不同遗传学表达策略的优缺点，以及光遗传学中现有局限和未来发展方向等进行了重点介绍，旨在通过对光遗传学技术的近期研究进展的简述为相关领域的发展研究提供参考。

1 光遗传学技术的发展

1979 年，Crick.F 提出神经生物学面临的主要挑战是如何特异地控制某一类型神经元的活性从而研究神经元以及神经环路与行为的关系。由于电极刺激作用缺乏细胞特异性，药物作用时间慢而缺乏时效性，Crick.F 随后提出光或许可以作为控制的手段，为光遗传学产生提供了初步设想依据[7]。

早在 1979 年以前，微生物学家就已经发现某些微生物能表达单一组分的光敏离子通道蛋白。Stoeckenius.D 和 Oesterhelt.S 在 1971 年证明了细菌视紫红质蛋白可在可见光条件下被激活，并作为通道蛋白实现离子的跨膜运输[3]。随后，1977 年，Matsuno-Yagi.A 和 Mukohata.Y 发现了这一家族的更多成员[8]。2002 年，Hegeman.P 等人进一步发现了视紫红质通道蛋白（channelrhodopsin，ChR）[9]。然而由于微生物视紫红质蛋白的光激活需要化学辅因子（顺式视黄醛）的参与，研究者们认为在哺乳动物神经元中利用微生物视紫红质蛋白进行光学控制并不是一个可行的策略[10]。

因此，研究者们试图通过多组分的感光蛋白或者感光小分子结合离子通道实现对神经元的光激活。2002 年，Zemelman.B 等人利用果蝇感光受体相关基因，包括视紫红质蛋白（rhodopsin），α-抑制蛋白（α-arrestin-2）以及 G 蛋白α亚基，开发了多组分光激活策略，命名为“chARGe”[11]，并在基因表达技术的帮助下，首次实现了利用光在一群混合的神经元中激活了某一小群特定的神经元[12][13]。类似的，Banghart.M 等人通过将光敏的化学分子偶联到钾离子通道上，在大鼠中实现了利用光精确可逆地控制神经元活性[14]。然而，多组分蛋白表达、对蛋白的化学修饰、化学小分子的组织穿透性等多方面的技术限制阻碍了多组份光遗传学的进一步应用。

直到 2005 年，Boyden.S 等人首次在哺乳动物神经元中成功表达微生物视紫红质蛋白，并在不需要其他的辅助因子或组分的条件下，成功实现了神经元的光激活。随后的研究证实哺乳动物的细胞中天然含有激活细菌视紫红质蛋白必要的辅因子顺式视黄醛[4]。随后几年中，类似的发现相继被报道。到 2010 年，多种微生物视紫红质蛋白，包括视紫红质通道蛋白（channelrhodopsin, ChR）、细菌视紫红质蛋白（bacterial rhodopsin）、盐细菌视紫红

质（halorhodopsin）均被证明能实现对哺乳动物神经元的光学激活或抑制，从而实现了在完整的哺乳动物脑组织甚至是自由运动的哺乳动物中对神经元的光遗传控制[15][16]。由此，打开了单组份光遗传学的大门。

2 光遗传学技术的相关进展

微生物视紫红质蛋白被证明可以用来激活神经元后，研究人员进一步发现了在生物体中天然存在的具有不同特性的光敏蛋白，命名为视蛋白。其中，在微生物体内存在的视蛋白（I型）多为离子通道和离子泵，脊椎动物中的视蛋白（II 型）多为 G 蛋白偶联受体[17][10]。由于微生物视蛋白具有更快的动力学特性和单组份基因操作优势[10]，光遗传学技术的进一步发展主要体现在对微生物视蛋白的优化改造，视蛋白的特异性定位表达以及光传输技术的发展等方面。

2.1 视蛋白的改造开发

2.1.1 光激活性视蛋白

视紫红质通道蛋白（ChR）是一种存在于单细胞藻类中的离子通道，其中应用最为广泛的是 ChR2（ChR 的一种亚型）[9]。ChR2 是一种非选择性阳离子通道，能在蓝光（420nm）作用下打开离子通道，使得神经元去极化并激活，并于 2005 年成功在体外培养的小鼠海马细胞中实现了神经元光控激活[4][18]。

与此同时，通过对 ChR2 的定点突变和嵌合体改造，具有不同动力学特性的视蛋白被进一步开发出来，满足了不同研究条件下的应用[10]。超高速视蛋白（ultrafast opsin）是具有高频激活和快速失活特性的 ChR2 突变体，主要包括 ChETA 和 ChIEF[19][20]。超高速视蛋白能够以高达 200Hz 的频率激活神经元并快速失活关闭，提高了对神经元的激活效率[21]。而通过延长 ChR2 通道的开放时间，研究者们改造出了具有长时激活特性的 ChR2 突变体-阶梯功能视蛋白（step-function opsin，SFO）[10]。其中，对 C128 位点的突变将 ChR2 的通道开放时间延长了数秒[22]，对 D156 位点的突变则将通道失活时间延长至了分钟级别[23]，由此得到的突变体分别在不同研究中得到了利用。而基于这两种 ChR2 突变体嵌合改造得到的双稳态激活性阶梯功能视蛋白（stabilized step-function opsin，SSFO ）则具有在通道开放和失活状态下皆具稳态的特性，实现了通过蓝光激活而黄光失活的特性操控，有利于对神经通路的长时程控制[24]。

除以上主要由蓝光激活的微生物视蛋白以外，红光激活的视蛋白-红移视蛋白（red-shifted opsin）同样引起了研究者们的兴趣。由于红光波长较长，具有较好的组织穿透性，在深部脑区的光遗传控制将更为便利，与此同时，红移视蛋白的发现大大增加了视蛋白种类，扩大了可利用的视蛋白工具库。而红光激活的特性使得红移视蛋白可与蓝光激活的视蛋白以及遗传编码的钙离子荧光探针（GECIs）等联合使用，实现了对神经元神经环路的多种光学控制或同步记录[10]。VChR1 是存在于团藻的红移视蛋白，可在 535nm 下被激活并

引起神经元去极化[25]，基于 VChR1 改造的突变体 C1V1 和 ReaChR 则可在 539nm 下实现最大激活效应，并在哺乳动物神经元中展现了更良好的膜定位表达能力[24][26]。而通过对超过 100 种藻类的基因组从头测序（de-novo sequencing），红移视蛋白 Chrimson 和 Chronos 也相继得到发现， Chrimson 可在 585nm 光刺激下展现最大的光电流，较其他红移视蛋白有更长的红移特性，Chronos 则还可在黄光或者蓝光条件下被激活并具有快速动力学特性，良好的激活光谱差异使得 Chrimson 可以与 Chronos 配合使用，实现用红光和蓝光同时激活两群独立的神经元而不被互相干扰[27]。而由于 Chrimson 还可在更长波长下（720nm）被激活，从而在与钙离子荧光探针的配合使用中展现了巨大优势[21]。

2.1.2 光抑制性视蛋白

在神经生物学的研究中，神经元的抑制对于神经环路功能的探究同样重要。光抑制性视蛋白是指可被光激活并引起神经元抑制作用的一类视蛋白，其中利用最为广泛的是盐细菌视紫红质（halo rhodopsin）中的 NpHR 视蛋白[28]。NpHR 是一种氯离子泵，可在光照刺激下将氯离子泵入胞内，使得神经元超极化从而引发神经元抑制，而通过对 NpHR 进行结构变异和嵌合，研究者们改造出了可在绿光，黄光或者红光条件下广谱激活的 eNpHR3.0 改造体[29]。通过在体外培养的海马神经元中的表达，eNpHR3.0 进一步被发现可在 590nm 下实现最大激活光电流和更优化的膜定位能力[16]。然而通过 eNpHR3.0 实现的神经元抑制可导致 $GABA_AR$ 的翻转电位改变，从而使神经元的可兴奋性受到干扰，因此，eNpHR3.0 的应用受到了较多质疑[30]。除此之外，以 Arch[31]（一种在苏打盐红菌中发现的古紫质蛋白），Mac[32]（存在于真菌）和 eBR[33]（一种在嗜盐菌中发现的视紫红质蛋白）为代表的质子泵视蛋白也得到了较多关注，这类视蛋白主要是通过将质子泵出胞外来抑制神经元，不仅对 GABA 神经元兴奋性干扰较小，在快速去失活和光电流产生速率方面也比氯离子泵类的视蛋白具有更大优势[31]。

同光激活性视蛋白相同，研究人员也致力于改造出红光控制的抑制性视蛋白。基于 Arch 和 Mac 改造的突变体 eArch3.0，eArchT3.0 和 eMac3.0 均具有更长波长激活的特性，均可在 520nm-550nm 光控下激活[34]。而近来在盐细菌中发现并优化的 Jaws 氯离子泵视蛋白则具有更加高效的红移光敏特性和非侵入性的神经元抑制特性，从而使得 Jaws 在深部脑组织研究中应用十分广泛[34]。然而红光控制的视蛋白激活在神经元中仍然受到神经元髓鞘对于光学传导的限制，由此光源在神经组织中输送的稳定性仍需提高[34]。

由于在单光子条件下离子泵只能转运单个离子，在效用和稳定性上均不如之前提到的离子通道视蛋白，因此，研究者们在 C1C2 蛋白结构上改造出了具有抑制效应的氯离子通道视蛋白 iC1C2，后者可在蓝光下被激活并具有快速动力学的特性[35]。而抑制性阶梯功能视蛋白的开发则进一步满足了长时程抑制神经元的要求，基于 ChR 突变改造的抑制性阶梯功能视蛋白 SwiChR 可在短时间的光照下引发长时间抑制，从而避免了长时程光照对细胞毒性的影响，而第一代突变体 SwiChRr 除长时抑制外，还可像 $GABA_AR$ 氯离子通道一样可逆并稳定地打开氯离子通道，实现对神经元活性的细微调节[30]。第二代突变体 SwiChRr 则有比 $GABA_AR$ 氯离子通道更慢的动力学特性，从而满足了对神经元活动的细微调节和交互行为的研究需求[21][36]。表 1 给出了几种常见光遗传学工具及其特性。

表 1　常见视蛋白特性参数

年份	光控元件	离子选择性	激活/抑制	激活光谱（nm）	参考目录
2005	ChR2	阳离子通道	激活	400-500	[4]
2012	ChETA	阳离子通道	激活	400-500	[19]
2014	SSFO[1)]	阳离子通道	激活	470/590	[21]
2014	Chrimson[2)]	阳离子通道	激活	585/720	[26]
2011	C1V1	阳离子通道	激活	550-570	[23]
2008	NpHR2	氯离子泵	抑制	590-620	[28]
2014	iC1C2	氯离子通道	抑制	475	[55]
2016	SwichR[3)]	氯离子通道	抑制	475/632	[35]

1）SSFO 被 470nm 的短时间蓝光激活并可以维持 30min，被 590nm 的红光解除激活

2）Chrimson 可在两种波长下分别激活，585nm 下达到最大信号而 720nm 下可与钙离子荧光探针连用

3) SwiChR 被 475nm 的短时间蓝光激活，被 632nm 的红光解除激活

视蛋白的改造开发还集中于探索膜定位以及亚细胞结构定位方面。通过将信号肽或与细胞器定位相关的基因片段与视蛋白融合，研究者们实现了视蛋白在亚细胞结构中的富集表达[29]。以 eNpHR3.0 的改造为例，通过将 NpHR 的 N 端同钾离子通道 Kir2.1 的 ER 运出序列融合并在其内部中插入高尔基转运序列 TS 可使得 eNpHR3.0 在膜定位和光电流强度上得到极大提升[29]。除此之外，在 ChR2 中融合肌球蛋白 Va 或 VI 结合域的序列极大增强了 ChR2 在树突或轴突膜的定位[21]，在 Arch3 中融合突触小泡蛋白的基因序列则可以实现其在突触前膜的表达[37]。而基于新近发现的光敏通道蛋白 CoChR 改造的 soCoChR 还可以集中在神经元的胞体中表达[38]。这些定位改造大大促进了视蛋白在神经环路精确控制中的应用。而亚细胞结构定位的改造可导致视蛋白的表达量降低从而影响光电流的产生，因此增强表达量和定位的特异性以及提高胞内光源有效递送等是未来的优化方向。

2.2 视蛋白的定位表达

神经环路组成的高度多样性与复杂性，使得标记特定的细胞类型或者神经投射对光遗传学在神经生物学中的研究十分重要。目前，主要可以通过使用包含视蛋白基因与细胞特异性启动子的病毒载体侵染，建立转基因小鼠品系，以及基因敲入（knock-in）等方式实现视蛋白在神经环路中特异性表达的目标[39][40]。

首先，将视蛋白表达在特定神经元中最简单也最常用的方法是将包含细胞特异性启动子和视蛋白的基因片段包装在病毒载体中并注射到特定脑区，通过病毒的侵染实现视蛋白表达（图 1a，图 2a）[21]。常用的病毒载体主要有慢病毒（lentivirus），腺相关病毒（adeno-associated virus，AAV），狂犬病毒（rabies virus）以及单纯疱疹病毒（herpes simplex virus，HSV）等[21]。其中，慢病毒可以通过插入细胞基因组来实现长时间稳定表达，然而其感染效率较低，不适宜直接用于动物实验[41]。对于腺相关病毒（AAV），尽管表达时间相对较短，但其感染效率高，装载能力大，因此更广泛被用于神经环路的研究[42]。而具有逆向跨突触侵染能力的狂犬病毒和正向跨突触侵染能力的单纯疱疹病毒在神经环路与投射的研究中也具有广泛的应用[43]。常用的神经元特异性启动子包括 CaMKIIα（特异表达在大脑皮层兴

奋性神经元），DRD（特异表达在伏核神经元）以及 MBP（特异表达在少突细胞）等[21][44]。而当研究某一小群神经元功能时，则需用到更加特异的启动子，比如酪氨酸羟化酶（tyrosine hydroxylase，TH）可以特异性标记多巴胺能神经元，从而可以用于多巴胺能神经元的功能研究[45]。研究不同种类神经元的功能需要寻找更多具有特异性的启动子，其中，单细胞测序技术（single-cell sequencing）的发展将大大推动神经元的功能分类，可以为标记特异神经元提供更多信息。通过视蛋白对神经环路的激活或抑制，研究者们揭示阐明了多种神经环路的功能，包括表达下视丘分泌素的丘脑神经元调节睡眠与觉醒的转换机制以及表达 DRD2 的伏核（nucleus accumbens）神经元调节风险选择的机制等[16][21]。然而由于病毒载体可以包装的特异性启动子片段长度有限，限制了视蛋白在某些神经元中的表达，这一方法的应用存在局限。

利用转基因技术可以解决这一难题。通过建立在特定神经细胞中表达视蛋白的转基因小鼠品系，可以实现视蛋白的稳定表达，从而为该类神经元或神经环路的研究提供方便[32]。而这一技术的缺陷在于无法同病毒载体侵染技术一样达到空间位置的高度准确性，其次，在研究不同的视蛋白或者不同神经环路的作用时，需要重新建立稳定的转基因小鼠品系，在操作和时间花费方面都不太合理。

基因敲入技术（genetic knock-in technique）则完美兼顾了神经元空间准确性表达和简便操作的优点。以重组酶系统（Cre-LoxP 或 Flp-Frt）技术为例，通过构建在特定神经元中表达 Cre 或者 Flp 重组酶品系的小鼠，然后将受通用启动子控制并依赖重组酶的视蛋白包装在病毒载体中并注射到待研究的脑区，便可实现将视蛋白表达在特定神经元中[32][46]（图 1b）。由于这一策略大大降低了对病毒载体装载能力的限制并具有高度准确性和操作简便的优点，这一技术在光遗传学领域开展最为广泛，并使得很多神经环路的研究成为了可能，例如表达小清蛋白的皮层中间神经元如何调控社交行为等[21]。但这一策略也受到一些因素的限制，比如建立重组酶品系需要较长的时间，以及对于某一群待研究的神经元缺乏特异性的启动子，无法精确定位特定类型的神经元和组织等。总之，利用基因敲入技术实现视蛋白神经元特异性表达这一策略将随着技术的改进得到更广泛的应用。

神经环路研究的另一个重要方面是研究不同脑区的投射关系如何控制行为。目前的研究难点主要集中于如何利用视蛋白将脑区之间功能性连接可视化这一问题上。理论上来讲，利用光直接刺激表达视蛋白的投射神经纤维可以实现对下游脑区的激活，然而这一方法需要数周的时间将足够的视蛋白表达在长投射的神经纤维上，并需要在预先探索脑区之间的投射关系基础上进行[21]。除此之外，还可以通过对神经元的弥散-组合标记（sparse-combinatorial labeling）来探索脑区之间的投射关系，但此法具有一定盲目性[47]。由此，科学家们进一步开发了跨轴突逆向侵染病毒，犬腺病毒(Canine Adenovirus ,CAV）便是其中一种。假设我们有一种在脑区 X 中稳定表达 Cre 重组酶品系的小鼠，当包含 Cre 依赖的视蛋白 CAV 病毒载体被注射到脑区 X，在 Cre 重组酶的作用下视蛋白基因将被重组从而实现在脑区 X 的表达，再通过重新复制并包装视蛋白颗粒的 CAV 病毒逆突触侵染在 Cre 神经元的上游脑区 Y ，Y 区胞体也将得到视蛋白的表达，从而可以通过光刺激上游脑区 Y 的神经元胞体实现对这一投射环路的激活[48][49]（图 2b）。除此之外，高效的狂犬病毒（Rabies Virus）同样具有跨轴突逆向侵染的特性，因此也常被用于研究脑区之间的功能性连接，然而由于狂犬病毒有较强的神经毒性，其应用受到了限制，新开发的 CVS-N2c$^{\Delta G}$狂犬病毒株神经毒性较小，扩大了狂犬病毒在光遗传学中的应用[50]。经过基因编辑的疱疹病毒科的伪狂犬病病毒（Pseudorabies

virus）也可以用于逆轴突标记，但是其对实验动物的感染致死性限制了其广泛使用[51]。

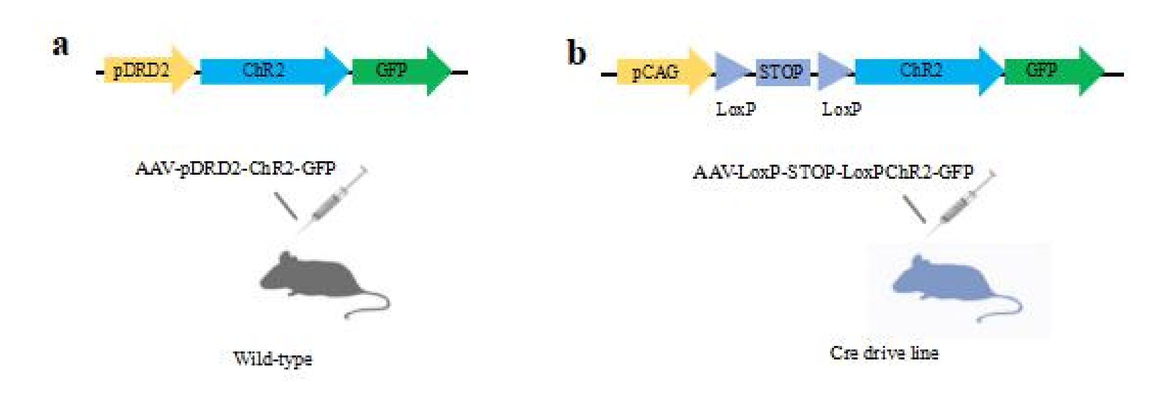


图 1 视蛋白定位表达技术[21]

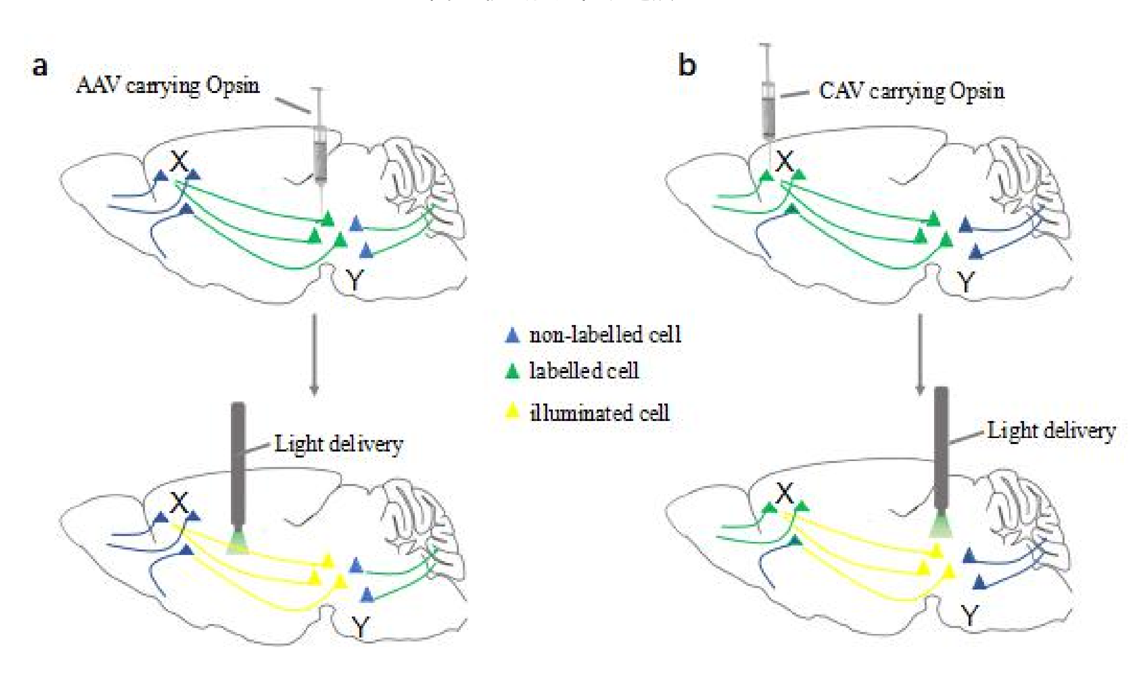


图 2 视蛋白在小鼠脑区的表达激活[21]

相比于跨突触逆向侵染病毒在神经生物学的广泛应用，跨突触正向侵染病毒的发展远远落后，以单纯疱疹病毒 H129 株系[52]（Herpes simplex virus H129）以及水泡型口炎病毒[53]（Vesicular stomatitis virus）为代表的跨突触正向侵染的病毒是目前主要研究的正向侵染病毒载体，然而两者的细胞毒性限制了进一步应用[21]。近来研究还发现腺相关病毒（adeno-associated viruses，AAV）包括 AAV1 和 AAV9 也具有正向跨突触侵染的特性[54]，因此，高效的正向追踪病毒有待于进一步的开发和改造。

2.3 光传输技术

光传输技术主要包括光源和将光源递送到组织的传输技术。激光 （diode or diode-pumped solid state，DPSS）和 LED（light-emitting diodes）是常用的两种光源[55]。激光的主要优点是光谱范围非常窄（<1nm），在多色光遗传和成像中减少了交叉干扰，另一

个优点是低发散性，大大提高了耦连光纤进行传输的效率。但主要缺点是价格昂贵以及在某些波段的刺激频率受限[16]。LED 光源不需要复杂的电子控制元件，造价较低，在用于发展无线传输方面具有较大潜力，并能轻松实现高频刺激。但主要缺点是较宽的波长范围以及较大的发散性，后者限制了高强度光传输[55]。

目前，传输技术最常用的方法是光纤传输。光纤传输用到的光纤直径通常几十到几百微米，通过将其植入到目标脑区，并与光源耦连，便可以实现在自由运动动物中的光输入。当输入的光强（取决于所用的视蛋白种类和其表达量）超过视蛋白激活所需要的阈值时，便可以激活视蛋白从而引起神经元的激活或抑制，触发 ChR2 动作电位所需的光强一般为 5 mW/mm^2[15]。在植入光纤末端所需光强已知的情况下，由于散射和被周围脑组织吸收的影响，光纤末端周围的光强将随距离增大而逐渐递减，因此光纤植入技术只能激活一定区域内的视蛋白，并且无法实现周围区域的光照强度均一。虽然光强越强，有效激活范围越大，但光照引起的组织发热可对神经元造成损伤[56]。因此，除合适的光照强度以及对照实验之外，减少光强衰减和组织热损伤是光纤传输的未来发展方向。

光纤技术现已被广泛用于自由运动动物深部脑刺激的实验中，但光纤的植入仍会不可避免的造成一定程度的脑组织损伤以及局部出血，尤其是当使用大直径的光纤进行高强度光输入时[57]。因此，对于需要更大脑区的光刺激以及特殊空间位置的多点刺激，研究人员开发了小型化的微型光纤和锥形光纤[58]，从而减少了对组织的机械损伤。与此同时，包含成百上千微型光纤的光纤束可以被包在一个绝缘的套管中并植入目标脑区，从而实现对某一较大脑区的同时刺激或者不同脑区的顺序刺激[59]。而在植入光纤的一端接上硅片并耦连上光源阵列则是另一种多点刺激脑区的实验方案[60]。总之，这些多样化的光传输策略使得多脑区，多空间位置的光学输入更加方便有效。

3 光遗传学技术与其他技术的结合

在完成对目标神经元的激活或脑区激活后，神经元如何响应以及响应模式的记录对于研究神经环路与行为的因果关系也十分重要。目前，光遗传学技术主要通过与记录神经元活性的工具或技术联合来进行输出信号的记录，比如功能性核磁共振成像（fMRI），钙成像以及电生理技术等[21]。将光遗传学与全脑活性的记录技术 fMRI 结合使用，可以实现对脑部不同结构区域激活的研究，但是此方法的缺点是时间分辨率较差，较难用于快速反应的神经环路和自由运动的动物[61]。电生理是记录神经元活性的金标准，可以精确的刺激或记录一个神经元的活动，但是此方法的缺点是通量较低以及侵入性较强，对于神经元活性有一定影响。遗传编码的荧光探针与光遗传学的配合使用可以克服这些局限，例如遗传编码的钙离子探针（genetically encoded Ca2+ indicator, GECI）以及遗传编码的电压门控探针，可以实现在单光子刺激下视蛋白激活后的神经元活性记录，从而帮助阐明环路作用和神经元之间信息交互对于行为的影响。最新研究中，新型光敏蛋白 soCoChR 与双光子计算机生成全息技术（CGH）的结合成功实现了对单个神经元的光敏操作，并将响应时间压缩至 1 毫秒内，从而极大的提高了光遗传技术在探究特定的神经回路和大脑功能之间的因果关系的精确性，而 CGH 技术同时可支持 3D 成像，使得光学控制有望进一步用于复杂立体模型中[62]。

4 展望

作为过去十年来对神经生物学影响最大技术之一，光遗传学技术在临床疾病研究方面也展现了巨大潜力。帕金森小鼠模型（药物破坏多巴胺能神经元）中的研究表明，在小鼠纹状体区域中种植视蛋白表达的人类多巴胺能神经元之后，通过光激活这些多巴胺能神经元，实现了小鼠单瘫和爪颤的症状恢复，从而证实了多巴胺分子在帕金森病中的作用并初步试验了运用光遗传技术治疗帕金森病的可行性[5]。通过光遗传技术对异常放电神经元的抑制，在癫痫小鼠中初步实现了癫痫发作的预防[6]，而在无头果蝇中通过光学控制也实现了翅膀扇动[12]。此外，光遗传在抑郁症，精神分裂症，自闭症和药物成瘾等疾病模型中的研究也收获了初步成果[63]。而随着视蛋白特性和多样性的进一步开发，光遗传技术有望进一步应用至与人类更具亲缘关系的恒河猴等灵长类动物模型中[6]。光遗传技术近期还在心律失常疾病模型中被尝试作为新型起搏器，用于控制节律和收缩强度，以作为在对传统起搏器治疗无效的代偿治疗术式，在骨骼肌肌腱病变中还进一步被尝试用于恢复肌腱收缩性[64][65]。由此，光遗传技术无论是在病理和生理的机制研究，还是在疾病的治疗方面都具有极大的应用潜力。

然而目前光遗传技术仍存在较多问题，限制了其进一步发展。以视蛋白表达为例，同类神经元中的视蛋白表达水平差异可导致在相同光强度刺激下引起的效应与实际不同，致使神经环路中的整合反馈与生理情况产生偏差[66]。而视蛋白的光敏特性使得视蛋白表达的神经元在光刺激下同步激活或抑制，由此时间顺序上的神经元交互行为以及神经元本身的反应特性将被抑制[67]。虽然与 GECI 探针技术连用可实现对神经环路中神经元的激活顺序定位，但同步激活使得神经元的多维交互和快速环路的行为早期即被掩盖[10]。在利用病毒载体进行视蛋白表达方面，利用重组酶系统虽然可以实现神经元特异性表达，但不同脑区的定点表达以及表达的稳定均一性控制仍需在增加视蛋白表达的基础上尽量减少对于细胞本身物质表达的干扰。此外，光源的热效应以及对神经元的直接刺激性尚需要更多的改进以减少对脑组织的侵入性和更好的模拟生理情境。而光遗传技术在疾病中的应用研究还受限于疾病模型的构建，如何快速稳定构建符合生理情况的哺乳动物疾病模型将持续成为领域内的研究热点。

总之，光遗传学技术仍将快速发展，这项技术的应用也将帮助我们解答更多神经生物学的奥秘以及疾病治疗方面的问题。

参考文献

[1] Editorial. Method of the Year 2010 optogenetics[J]. Nature Methods, 2011, 8(1): 1.

[2] Deisseroth K, Feng G, Majewska A K, Miesenbock G, Ting A, Schnitzer M J. Next-Generation Optical Technologies for Illuminating Genetically Targeted Brain Circuits[J]. Journal of Neuroscience, 2006, 26(41): 10380 - 10386.

[3] Oesterhelt D, Stoeckenius W. Rhodopsin-like Protein from the Purple Membrane of Halobaterium halobium[J]. Nat. New Biol., 1971, 233: 149 - 152.

[4] Boyden E S, Zhang F, Bamberg E, Nagel G, Deisseroth K. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity[J]. Nature Neuroscience, 2005, 8(9): 1263 - 1268.

[5] Chen Y, Xiong M, Zhang S C. Illuminating Parkinson’s therapy with optogenetics[J]. Nature Biotechnology, 2015, 33(2): 149 - 150.

[6] Bentley J N, Chestek C, Stacey W C, Patil P G. Optogenetics in epilepsy[J]. Neurosurgical Focus, 2013, 34(6): E4.

[7] Crick F. The impact of molecular biology on neuroscience.[J]. Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences, 1999, 354(1392): 2021 - 5.

[8] Matsuno-Yagi A, Mukohata Y. Two possible roles of bacteriorhodopsin; a comparative study of strains of Halobacterium halobium differing in pigmentation[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1977, 78(1): 237 - 243.

[9] Nagel G, Ollig D, Fuhrmann M, Kateriya S, Musti A M, Bamberg E, Hegemann P. Channelrhodopsin-1: A light-gated proton channel in green algae[J]. Science, 2002, 296(5577): 2395 - 2398.

[10] Guru A, Post R J, Ho Y-Y, Warden M R. Making Sense of Optogenetics[J]. International Journal of Neuropsychopharmacology, 2015, 18(11): pyv079.

[11] Zemelman B V., Lee G A, Ng M, Miesenböck G. Selective photostimulation of genetically chARGed neurons[J]. Neuron, 2002, 33(1): 15 - 22.

[12] Lima S Q, Miesenböck G. Remote control of behavior through genetically targeted photostimulation of neurons[J]. Cell, 2005, 121(1): 141 - 152.

[13] Zemelman B V., Nesnas N, Lee G A, Miesenbock G. Photochemical gating of heterologous ion channels: Remote control over genetically designated populations of neurons[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003, 100(3): 1352 - 1357.

[14] Matthew Banghart1, 3, Katharine Borges2, 3, Ehud Isacoff2, Dirk Trauner1 AND R H K. Light-activated ion channels for remote control of neuronal firing[J]. Nature neuroscience, 2004, 7(12): 1381 - 1386.

[15] Aravanis A M, Wang L-P, Zhang F, Meltzer L A, Mogri M Z, Schneider M B, Deisseroth K. An optical neural interface: in vivo control of rodent motor cortex with integrated fiberoptic and optogenetic technology[J]. Journal of Neural Engineering, 2007, 4(3): S143 - S156.

[16] Adamantidis A R, Zhang F, Aravanis A M, Deisseroth K, De Lecea L. Neural substrates of awakening probed with optogenetic control of hypocretin neurons[J]. Nature, 2007, 450(7168): 420 - 424.

[17] Oesterhelt D, Stoeckenius W. Functions of a New Photoreceptor Membrane[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1973, 70(10): 2853 - 2857.

[18] Nagel G, Szellas T, Huhn W, Kateriya S, Adeishvili N, Berthold P, Ollig D, Hegemann P, Bamberg E. Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003, 100(24): 13940 - 13945.

[19] Lin J Y, Lin M Z, Steinbach P, Tsien R Y. Characterization of engineered channelrhodopsin variants with improved properties and kinetics[J]. Biophysical Journal, 2009, 96(5):

1803 - 1814.

[20] Gunaydin L A, Yizhar O, Berndt A, Sohal V S, Deisseroth K, Hegemann P. Ultrafast optogenetic control[J]. Nature Neuroscience, 2010, 13(3): 387 - 392.

[21] Kim C K, Adhikari A, Deisseroth K. Integration of optogenetics with complementary methodologies in systems neuroscience[J]. Nature Reviews Neuroscience, 2017, 18(4): 222 - 235.

[22] Berndt A, Yizhar O, Gunaydin L A, Hegemann P, Deisseroth K. Bi-stable neural state switches[J]. Nature Neuroscience, 2009, 12(2): 229 - 234.

[23] Bamann C, Gueta R, Kleinlogel S, Nagel G, Bamberg E. Structural guidance of the photocycle of channelrhodopsin-2 by an interhelical hydrogen bond[J]. Biochemistry, 2010, 49(2): 267 - 278.

[24] Fenno L, Yizhar O, Deisseroth K. The Development and Application of Optogenetics[J]. Annual Review of Neuroscience, 2011, 34(1): 389 - 412.

[25] Zhang F, Prigge M, Beyrière F, Tsunoda S P, Mattis J, Yizhar O, Hegemann P, Deisseroth K. Red-shifted optogenetic excitation: A tool for fast neural control derived from Volvox carteri[J]. Nature Neuroscience, 2008, 11(6): 631 - 633.

[26] Lin J Y, Knutsen P M, Muller A, Kleinfeld D, Tsien R Y. ReaChR: A red-shifted variant of channelrhodopsin enables deep transcranial optogenetic excitation[J]. Nature Neuroscience, 2013, 16(10): 1499 - 1508.

[27] Klapoetke N C, Murata Y, Kim S S, Pulver S R, Birdsey-Benson A, Cho Y K, Morimoto T K, Chuong A S, Carpenter E J, Tian Z, Wang J, Xie Y, Yan Z, Zhang Y, Chow B Y, Surek B, Melkonian M, Jayaraman V, Constantine-Paton M, Wong G K S, Boyden E S. Independent optical excitation of distinct neural populations[J]. Nature Methods, 2014, 11(3): 338 - 346.

[28] Han X, Boyden E S. Multiple-Color Optical Activation, Silencing, and Desynchronization of Neural Activity, with Single-Spike Temporal Resolution[J]. RUSTICHINI A. PLoS ONE, 2007, 2(3): e299.

[29] Gradinaru V, Thompson K R, Deisseroth K. eNpHR: A Natronomonas halorhodopsin enhanced for optogenetic applications[J]. Brain Cell Biology, 2008, 36(1 - 4): 129 - 139.

[30] Ferenczi E, Deisseroth K. When the electricity (and the lights) go out: Transient changes in excitability[J]. Nature Neuroscience, 2012, 15(8): 1058 - 1060.

[31] Chow B Y, Han X, Dobry A S, Qian X, Chuong A S, Li M, Henninger M A, Belfort G M, Lin Y, Monahan P E, Boyden E S. High-performance genetically targetable optical neural silencing by light-driven proton pumps[J]. Nature, 2010, 463(7277): 98 - 102.

[32] Gradinaru V, Zhang F, Ramakrishnan C, Mattis J, Prakash R, Diester I, Goshen I, Thompson K R, Deisseroth K. Molecular and Cellular Approaches for Diversifying and Extending Optogenetics[J]. Cell, 2010, 141(1): 154 - 165.

[33] Han X, Chow B Y, Zhou H, Klapoetke N C, Chuong A, Rajimehr R, Yang A, Baratta M V., Winkle

J, Desimone R, Boyden E S. A high-light sensitivity optical neural silencer: development and application to optogenetic control of non-human primate cortex.[J]. Frontiers in systems neuroscience, 2011, 5: 18.

[34] Chuong A S, Miri M L, Busskamp V, Matthews G A C, Acker L C, Sørensen A T, Young A, Klapoetke N C, Henninger M A, Kodandaramaiah S B, Ogawa M, Ramanlal S B, Bandler R C, Allen B D, Forest C R, Chow B Y, Han X, Lin Y, Tye K M, Roska B, Cardin J A, Boyden E S. Noninvasive optical inhibition with a red-shifted microbial rhodopsin[J]. Nature Neuroscience, 2014, 17(8): 1123 - 1129.

[35] Kato H E, Zhang F, Yizhar O, Ramakrishnan C, Nishizawa T, Hirata K, Ito J, Aita Y, Tsukazaki T, Hayashi S, Hegemann P, Maturana A D, Ishitani R, Deisseroth K, Nureki O. Crystal structure of the channelrhodopsin light-gated cation channel[J]. Nature, 2012, 482(7385): 369 - 374.

[36] Berndt A, Lee S Y, Wietek J, Ramakrishnan C, Steinberg E E, Rashid A J, Kim H, Park S, Santoro A, Frankland P W, Iyer S M, Pak S, Ährlund-Richter S, Delp S L, Malenka R C, Josselyn S A, Carlén M, Hegemann P, Deisseroth K. Structural foundations of optogenetics: Determinants of channelrhodopsin ion selectivity[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2016, 113(4): 822 - 829.

[37] Rost B R, Schneider F, Grauel M K, Wozny C, G Bentz C, Blessing A, Rosenmund T, Jentsch T J, Schmitz D, Hegemann P, Rosenmund C. Optogenetic acidification of synaptic vesicles and lysosomes[J]. Nature Neuroscience, 2015, 18(12): 1845 - 1852.

[38] Valluru L, Xu J, Zhu Y, Yan S, Contractor A, Swanson G T. Ligand binding is a critical requirement for plasma membrane expression of heteromeric kainate receptors.[J]. The Journal of biological chemistry, 2005, 280(7): 6085 - 93.

[39] Suzuki A, de la Pompa J L, Stambolic V, Elia A J, Sasaki T, del Barco Barrantes I, Ho A, Wakeham A, Itie A, Khoo W, Fukumoto M, Mak T W. High cancer susceptibility and embryonic lethality associated with mutation of the PTEN tumor suppressor gene in mice.[J]. Current Biology, 1998, 8(21): 1169 - 1178.

[40] Zhu P, Narita Y, Bundschuh S T, Fajardo O, Schärer Y-P Z, Chattopadhyaya B, Bouldoires E A, Stepien A E, Deisseroth K, Arber S, Sprengel R, Rijli F M, Friedrich R W. Optogenetic Dissection of Neuronal Circuits in Zebrafish using Viral Gene Transfer and the Tet System.[J]. Frontiers in neural circuits, 2009, 3: 21.

[41] Jiang W, Hua R, Wei M, Li C, Qiu Z, Yang X, Zhang C. An optimized method for high-titer lentivirus preparations without ultracentrifugation.[J]. Scientific reports, 2015, 5(1): 13875.

[42] Wold W S M, Toth K. Adenovirus vectors for gene therapy, vaccination and cancer gene therapy.[J]. Current gene therapy, 2013, 13(6): 421 - 33.

[43] Neve R L, Lim F. John Wiley & Sons, Inc., 2013. Generation of high-titer defective HSV-1 vectors.[J]. Current protocols in neuroscience, 2013Hoboken, NJ, USA: , Chapter 4: Unit 4.13.

[44] Mattis J, Brill J, Evans S, Lerner T N, Davidson T J, Hyun M, Ramakrishnan C, Deisseroth K, Huguenard J R. Frequency-Dependent, Cell Type-Divergent Signaling in the Hippocamposeptal Projection[J]. Journal of Neuroscience, 2014, 34(35): 11769–11780.

[45] Lammel S, Steinberg E E, Földy C, Wall N R, Beier K, Luo L, Malenka R C. Diversity of transgenic mouse models for selective targeting of midbrain dopamine neurons.[J]. Neuron, 2015, 85(2): 429–38.

[46] Fenno L E, Mattis J, Ramakrishnan C, Hyun M, Lee S Y, He M, Tucciarone J, Selimbeyoglu A, Berndt A, Grosenick L, Zalocusky K A, Bernstein H, Swanson H, Perry C, Diester I, Boyce F M, Bass C E, Neve R, Huang Z J, Deisseroth K. Targeting cells with single vectors using multiple-feature Boolean logic[J]. Nature Methods, 2014, 11(7): 763–772.

[47] Jefferis G S X E, Livet J. Sparse and combinatorial neuron labelling.[J]. Current opinion in neurobiology, 2012, 22(1): 101–10.

[48] Soudais C, Laplace-Builhe C, Kissa K, Kremer E J. Preferential transduction of neurons by canine adenovirus vectors and their efficient retrograde transport in vivo.[J]. The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 2001, 15(12): 2283–2285.

[49] Schwarz L A, Miyamichi K, Gao X J, Beier K T, Weissbourd B, Deloach K E, Ren J, Ibanes S, Malenka R C, Kremer E J, Luo L. Viral-genetic tracing of the input-output organization of a central noradrenaline circuit[J]. Nature, 2015, 524(7563): 88–92.

[50] Reardon T R, Murray A J, Turi G F, Wirblich C, Croce K R, Schnell M J, Jessell T M, Losonczy A. Rabies Virus CVS-N2c δG Strain Enhances Retrograde Synaptic Transfer and Neuronal Viability[J]. Neuron, 2016, 89(4): 711–724.

[51] Enquist L W. Exploiting circuit-specific spread of pseudorabies virus in the central nervous system: insights to pathogenesis and circuit tracers.[J]. The Journal of infectious diseases, 2002, 186 Suppl(s2): S209-14.

[52] Lo L, Anderson D J. A cre-dependent, anterograde transsynaptic viral tracer for mapping output pathways of genetically marked neurons[J]. Neuron, 2011, 72(6): 938–950.

[53] McGovern A E, Davis-Poynter N, Farrell M J, Mazzone S B. Transneuronal tracing of airways-related sensory circuitry using herpes simplex virus 1, strain H129.[J]. Neuroscience, 2012, 207: 148–66.

[54] Zingg B, Chou X, Zhang Z-G, Mesik L, Liang F, Tao H W, Zhang L I. AAV-Mediated Anterograde Transsynaptic Tagging: Mapping Corticocollicular Input-Defined Neural Pathways for Defense Behaviors.[J]. Neuron, 2017, 93(1): 33–47.

[55] Lammel S, Tye K M, Warden M R. Progress in understanding mood disorders: Optogenetic dissection of neural circuits[J]. Genes, Brain and Behavior, 2014, 13(1): 38–51.

[56] Yaroslavsky A N, Schulze P C, Yaroslavsky I V., Schober R, Ulrich F, Schwarzmaier H J. Optical properties of selected native and coagulated human brain tissues in vitro in the visible and near infrared spectral range[J]. Physics in Medicine and Biology, 2002, 47(12):

2059 - 2073.

[57] Zorzos A N, Scholvin J, Boyden E S, Fonstad C G. Three-dimensional multiwaveguide probe array for light delivery to distributed brain circuits[J]. Optics Letters, 2012, 37(23): 4841.

[58] Abaya T V F, Blair S, Tathireddy P, Rieth L, Solzbacher F. A 3D glass optrode array for optical neural stimulation[J]. Biomedical Optics Express, 2012, 3(12): 3087.

[59] Sileo L, Pisanello M, Della Patria A, Emhara M S, Pisanello F, De Vittorio M. Optical fiber technologies for in-vivo light delivery and optogenetics[C]//International Conference on Transparent Optical Networks. , 2015, 2015 - Augus.

[60] Royer S, Zemelman B V., Barbic M, Losonczy A, Buzs??ki G, Magee J C. Multi-array silicon probes with integrated optical fibers: Light-assisted perturbation and recording of local neural circuits in the behaving animal[J]. European Journal of Neuroscience, 2010, 31(12): 2279 - 2291.

[61] Lee J H, Durand R, Gradinaru V, Zhang F, Goshen I, Kim D S, Fenno L E, Ramakrishnan C, Deisseroth K. Global and local fMRI signals driven by neurons defined optogenetically by type and wiring[J]. Nature, 2010, 465(7299): 788 - 792.

[62] Shemesh O A, Tanese D, Zampini V, Linghu C, Piatkevich K, Ronzitti E, Papagiakoumou E, Boyden E S, Emiliani V. Temporally precise single-cell-resolution optogenetics[J]. Nature Neuroscience, 2017.

[63] Cho K K A, Sohal V S. Optogenetic approaches for investigating neural pathways implicated in schizophrenia and related disorders[J]. Human Molecular Genetics, 2014, 23(R1).

[64] Nyns E C A, Kip A, Bart C I, Plomp J J, Zeppenfeld K, Schalij M J, De Vries A A F, Pijnappels D A. Optogenetic termination of ventricular arrhythmias in the whole heart: Towards biological cardiac rhythm management[J]. European Heart Journal, 2017, 38(27): 2132 - 2136.

[65] Bruegmann T, Van Bremen T, Vogt C C, Send T, Fleischmann B K, Sasse P. Optogenetic control of contractile function in skeletal muscle[J]. Nature Communications, 2015, 6.

[66] Häusser M. Optogenetics: The age of light[J]. Nature Methods, 2014.

[67] Kravitz A V., Bonci A. Optogenetics, physiology, and emotions[J]. Frontiers in Behavioral Neuroscience, 2013.